

VACUNAS PREVENTIVAS CONTRA EL CÁNCER

Leticia Rocha Zavaleta*

RESUMEN

La aplicación de vacunas profilácticas ha permitido la eliminación de un número considerable de enfermedades humanas. Sin embargo, el diseño de vacunas contra el cáncer ha sido difícil. En los primeros intentos por inducir protección contra tumores se utilizaron células tumorales inactivadas completas como blanco para el sistema inmune. Posteriormente, con el descubrimiento de los antígenos asociados a tumores las vacunas se hicieron más específicas, así como, las respuestas inducidas por éstas. El advenimiento de los ratones transgénicos, que expresan diferentes antígenos asociados a cánceres humanos, ha provocado un incremento en el conocimiento del potencial anti-tumoral del sistema inmune. La prueba de diversos tipos de vacunas en modelos de ratones transgénicos, ha demostrado que el sistema inmune es capaz de bloquear la carcinogénesis mediada por células que expresan antígenos asociados a tumores. Los datos existentes sugieren que vacunas altamente inmunogénicas pueden romper la tolerancia natural hacia los tumores, además de activar a los diferentes componentes del sistema inmune para controlar su desarrollo. Muchos estudios se están llevando a cabo con la finalidad de entender las interacciones que se establecen entre las células inmunológicas y tumorales, lo cual resultará útil para el diseño de mejores vacunas contra el cáncer.

Palabras Clave: Vacunas, cáncer, profilaxis.

Protective cancer vaccines

ABSTRACT

Application of vaccines has allowed elimination of a number of human diseases. However, design of protective cancer vaccines has been difficult. Pioneer attempts used inactivated, whole tumour cells as target for the immune system. Later, the discovery of tumour-associated antigens (TAA) granted more specific vaccine formulations. The advent of transgenic mice expressing particular human TAA, has led to an increase of the knowledge about the anti-tumour potential of the immune system. Testing of different vaccines in transgenic models has demonstrated the feasibility of immune protection against carcinogenesis mediated by TAA-expressing cells. Current data suggest that highly immunogenic vaccines are able to brake natural tolerance to tumours and activate the different arms of the immune system to control the development of cancer. Ongoing studies to understand the interactions between immune and tumour cells, will be usefull for the ultimate design of future cancer vaccines.

Key words: Cancer, vaccines, prevention.

ARTÍCULO RECIBIDO EN ABRIL DEL 2003 Y ACEPTADO EN MAYO DEL 2003.

ANTECEDENTES

Por largo tiempo la vacunación ha sido la práctica más exitosa en la medicina preventiva¹. Sin embargo, la aplicación de vacunas para la prevención del desarrollo de tumores ha resultado complicada y no se han registrado éxitos importantes². Estudios de Inmunología Tumoral se han enfocado a la búsqueda de mecanismos para activar específicamente al sistema inmune para controlar el crecimiento de tumores *in vivo*. De tal forma, la identificación de antígenos que se expresan en las células

tumorales, ya sea de manera selectiva o bien abundantemente, han sentado las bases para el diseño de vacunas contra el cáncer. A pesar de que los estudios básicos pueden ser bien diseñados, y los modelos pre-clínicos en animales continúan siendo desarrollados y usados para probar los principios científicos en constante descubrimiento, existen serias dudas acerca de su aplicabilidad en seres humanos sanos.

La forma más clara de vacuna profiláctica contra el cáncer es sin duda aquella que se dirige contra microorganismos causantes de cánceres humanos, como el Virus del Papiloma Humano^{3,4}. Este tipo de vacunas se enfoca a prevenir no sólo la infección viral

* Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, México D.F. E-mail: lrochaz@servidor.unam.mx

sino también, de forma indirecta, el desarrollo del cáncer. Sin embargo, sólo un porcentaje mínimo de cánceres humanos están asociados con una etiología viral, por lo que, el diseño de vacunas profilácticas requiere enfocar sus esfuerzos hacia novedosas moléculas blanco.

En la presente, se revisarán las opciones de vacunas profilácticas contra el cáncer que se han reportado y probado en diferentes modelos animales, poniendo especial énfasis en el tipo de antígeno blanco que se ha utilizado, así como, la utilidad de los modelos animales recientemente desarrollados.

VACUNAS PROFILÁCTICAS

El mecanismo de generación de protección de las vacunas se basa en la exposición primaria del sistema inmune a un antígeno determinado, generalmente un determinante antigénico viral, el cual induce una respuesta inmunológica de memoria. Esta respuesta de memoria es activada cuando el patógeno ingresa al organismo, mismo que es neutralizado por las defensas del organismo.

Dado lo anterior, para que una vacuna pudiera proteger contra el desarrollo de un tumor, sería necesaria la existencia de antígenos propios del tumor que, al ser vacunados en un individuo sano, generaran una respuesta inmune de memoria.

Existen dos escuelas de pensamiento en el campo de vacunas profilácticas contra el cáncer. La primera plantea el uso de células tumorales completas como inmunógenos. La segunda plantea el uso de antígenos únicos asociados al tumor como arma de inmunización.

VACUNAS DE CÉLULAS COMPLETAS

Los primeros experimentos de vacunación contra el cáncer, utilizando células completas, datan de la década de los 60s²; durante varias décadas se han llevado a cabo ensayos utilizando células de tumores autólogos y alogénicos para inducir una respuesta inmune en contra del arreglo total de antígenos expresados en tumores individuales⁶, lográndose demostrar que incluso tumores que en experimentos convencionales son incapaces de inducir una respuesta inmune significativa, fueron rechazados cuando los organismos singénicos fueron eficientemente inmunizados⁷.

Desafortunadamente, la complejidad del estímulo antigénico, debido a la gran cantidad de antígenos presentes en las células tumorales, hizo difícil la detección de una respuesta inmune específica mediada por la vacuna, y por lo tanto, tampoco ha sido posible correlacionar el evento inmunológico con el resultado clínico. Las masas tumorales están formadas por una pléyade de células, que aunque de origen monoclonal, sufren un proceso de transformación continuo que las lleva a presentar fenotipos distintos. Esto fue demostrado en estudios con tumores inducidos por carcinógenos, en los que fue difícil encontrar la presencia de antígenos compartidos (aquellos que se expresan en múltiples tumores del mismo tipo tisular)⁸, y antígenos de protección

cruzada (aquellos cuya inmunización puede prevenir la ocurrencia de tumores en diferentes individuos)⁹.

Estos hallazgos parecen sugerir que la búsqueda de antígenos específicos de tipos tumorales podría brindar una mejor estrategia para el diseño de vacunas.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES COMO VACUNAS CONTRA EL CÁNCER

El proceso carcinogénico de algunos tumores produce cambios a nivel de la expresión de ciertos genes, en algunos casos se observa la sobre-expresión de algún producto génico, en otras se detecta la expresión de alguna proteína que no corresponde con el patrón de expresión normal de la célula en proceso de transformación. Cuando estos productos de la transformación son expresados en las membranas de las células tumorales son conocidos como antígenos asociados a tumores.

Los antígenos asociados a tumores, que específicamente son reconocidos por linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos) en el contexto de las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), han sido seleccionados para ser usados como vacunas en la mayoría de ensayos clínicos realizados hasta la fecha. Se han observado resultados promisorios después de la vacunación con péptidos antigénicos derivados de los antígenos MAGE-3 y NY-ESO-1 detectados en carcinoma de testículo, y con los antígenos de diferenciación de melanocitos Melan-A/MART-1, tirosinasa y gp100¹⁰⁻¹⁵. En estos casos se pudo detectar una respuesta inmune péptido-específica asociada con la regresión de metástasis en algunos pacientes¹⁶⁻¹⁹.

Dentro del grupo de antígenos asociados a tumores, también se consideran aquellos antígenos que se sobreexpresan en las células tumorales, y aquellos que son producto de agentes virales asociados con algunos tipos de carcinogénesis. Estos antígenos también pueden representar blancos para la intervención inmunológica, ya sea preventiva o terapéutica²⁰⁻²³.

Alternativamente, la inducción de respuestas de linfocitos CD4⁺ restringidas a las moléculas de clase II del MHC están siendo incluidas en diversas vacunas contra el cáncer. Así, a partir de antígenos asociados a tumores conocidos y de reciente descubrimiento se están derivando péptidos que son presentados por diferentes alelos del MHC clase II y son reconocidos por linfocitos CD4⁺ de pacientes con cáncer, éstos están siendo evaluados principalmente como blancos para aumentar la respuesta inmune antígeno-específica in vivo²⁴⁻²⁷.

Un resumen de los antígenos asociados a tumores que han sido utilizados con mayor frecuencia en el desarrollo de vacunas contra el cáncer humano se muestra en la Tabla I.

RATONES TRANSGÉNICOS COMO MODELOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS PROFILÁCTICAS CONTRA EL CÁNCER

Tradicionalmente las pruebas pre-clínicas de vacunas contra el

VERTIENTES

Antígeno	Cáncer asociado
Antígeno Prostático	Cáncer de Próstata
Antígeno Prostático de Membrana	Cáncer de Próstata
Tirosinasa	Melanoma
Gp100	Melanoma
a-fetoproteína	Cáncer de Hígado
Idiotipo de Ig	Mieloma, Linfoma no Hodgkin's de células B
TCR	Linfoma no Hodgkin's de células T
Bcr-abl	Leucemia Mieloide Crónica
p53 mutante	Carcinoma de Pulmón, Colorectal, de Cabeza y Cuello
MAGE-1, MAGE-3	Melanoma, Cáncer de Pulmón y Colorectal
NY-ESO-1	Melanoma y Cáncer de Mama
Her-2/ <i>neu</i>	Cáncer de Mama, Pulmón y Ovario
Muc-1	Cáncer Pancreático, Colorectal, de Mama y Pulmón

Tabla I. Antígenos asociados a tumores que son reconocidos por linfocitos T y se consideran moléculas blanco para vacunas contra el cáncer.

cáncer se han llevado a cabo en ratones de laboratorio, los modelos más empleados han sido el de tumorigénesis química y el de tumores transplantados. En el primero los ratones son expuestos a cantidades inusuales de sustancias fuertemente cancerígenas, en el segundo se emplean líneas celulares derivadas de tumores que son transplantadas en ratones sanos para la generación de una masa tumoral. Ninguno de los modelos antes mencionados semeja el proceso natural de desarrollo de un tumor, ya que normalmente el cáncer es una enfermedad asociada con eventos característicos de la edad avanzada, o bien con alteraciones de los sistemas de defensa tanto molecular como inmunológico.

La posibilidad de generar ratones transgénicos ha permitido llevar a cabo experimentos para probar la posible utilidad de vacunas contra el cáncer basadas en antígenos asociados a tumores. Algunos de los modelos más representativos son los siguientes:

Her-2/neu

Los ratones transgénicos que sobre-expresan el proto-oncogen *Her-2/neu*, o sus formas mutadas, constituyen un modelo para pruebas de inmunoprevención de la carcinogénesis mamaria. Estos ratones expresan diferencialmente la proteína r-p185^{neu} durante diferentes etapas de su vida. Como consecuencia, sus niveles de tolerancia a esta proteína y la agresividad de la carcinogénesis son diferentes durante dichas etapas. La carcinogénesis ocurre en ratonas núbiles o inmediatamente después del embarazo y puede involucrar desde una hasta las diez glándulas mamarias²⁸.

La carcinogénesis mamaria en estos animales transgénicos es inhibida gracias a la vacunación con proteínas, péptidos o DNA plasmídico^{29,39}. En estos casos la inhibición del

crecimiento tumoral fue mediada por una reacción de hipersensitividad de tipo retardado (DTH) con la presencia de IFN- γ por anticuerpos^{33,36,39}. En muchas líneas de ratones transgénicos, la vacunación anti-p185^{neu} parece incapaz de inducir una respuesta citotóxica contra células que expresan el antígeno^{33,36,39}, esto podría deberse a la dificultad para romper la tolerancia inmunológica. Por otra parte, resulta muy interesante el hallazgo de que la vacunación indujo la generación de anticuerpos que fueron capaces de bloquear la carcinogénesis, esto podría deberse a una inhibición de la habilidad de p185^{neu} como transductor de señales, así como, a la regulación negativa de su expresión en la membrana de las células pre-neoplásticas²⁵. En contraste, el papel de los anticuerpos inducidos por las vacunas en el rechazo contra tumores positivos a la presencia de p185^{neu} transplantados en los ratones fue controversial, ya que en algunos protocolos, los anticuerpos amplificaron la protección inducida por linfocitos T⁴⁰, mientras que en otros una fuerte respuesta mediada por linfocitos citotóxicos (CTL) indujo el rechazo del tumor incluso en ausencia de anticuerpos⁴¹.

De tal forma los resultados parecen indicar que mecanismos inmunológicos independientes de la reacción mediada por CTL pueden inhibir la oncogénesis, pero no participar en el rechazo contra tumores transplantados.

CEA y MUC

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un antígeno asociado a tumores muy bien definido y caracterizado. Se han generado líneas de ratones transgénicos que expresan el antígeno de origen humano bajo el control de su promotor natural^{42,43}. Por otro lado, MUC es un antígeno asociado a tumores que se encuentra presente en pacientes con adenocarcinomas epiteliales^{44,45}. En este caso también se han desarrollado ratones

transgénicos que expresan el antígeno bajo el control de su promotor natural. En estos modelos transgénicos se ha observado la existencia de tolerancia hacia el desarrollo de tumores, sin embargo, se ha logrado demostrar que dicha tolerancia puede ser rota mediante la aplicación de vacunas altamente inmunogénicas⁴⁶⁻⁴⁸, que protegen a los ratones contra el proceso carcinogénico.

Los tipos de vacunas más comúnmente usadas para la defensa contra el cáncer son las compuestas por proteínas completas, las recombinantes que contienen péptidos inmunodominantes, las vacunas que utilizan virus como vectores, y más recientemente las vacunas génicas que constan de un DNA plasmídico que expresa la proteína o péptido de interés.

CONCLUSIONES

La efectividad de las vacunas profilácticas en el ser humano es indiscutible, sin embargo, la posibilidad de generar vacunas que nos protejan contra el desarrollo de tumores es aún controversial. La falta de modelos adecuados para el estudio de la respuesta inmune inducida por vacunas antitumorales ha limitado el conocimiento en esta área. Con el advenimiento de los ratones transgénicos, con predisposición a la generación de tumores particulares, se ha adelantado en el entendimiento de los elementos del sistema inmune que resultan vitales para el rechazo de tumores. Los datos descritos en esta revisión nos llevan a pensar que las vacunas contra el cáncer son posibles, siempre y cuando su desarrollo se base en la existencia de antígenos asociados a tumores altamente específicos, que sólo se expresen en las células tumorales y que permitan por tanto, una respuesta igualmente especializada, sin causar daño a tejidos sanos.

REFERENCIAS

1. Ada G. Vaccines and vaccination. *N Eng J Med* 2001; 345:1042-1053.
2. Forni G, Lollini PL, Musiani P, Colombo MP. Immunoprevention of cancer: is the time ripe?. *Cancer Res* 2000; 60: 2571-2575.
3. Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998; 23: 27-30.
4. zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing major human cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 252-253.
5. Klein G, Sjogren HO, Klein E. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960; 20: 1561-1565.
6. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jeckson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligna R. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3539-3543.
7. Boon T. Antigenic tumor cell variants obtained with mutagens. *Adv Cancer Res* 1983; 39: 121-151.

8. Henderson RA, Finn OJ. Human tumor antigens are ready to fly. *Adv Immunol* 1996; 62: 217-256.
9. Edelman AS, Xue B, Sanchez P, Thorbecke J. Cross-reactive cellular and humoral immunity to carcinogen-induced chicken fibrosarcomas. I. Protective cross-immunity between transplatable tumor lines. *J Immunol* 1985; 135:2206-2212.
10. Bakker AB, Schreurs MWJ, deBoer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, Figdor CG. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1005-1009.
11. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, DePlaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; 178: 489-495.
12. Chen YT, Scania MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Willaimson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1914-1918.
13. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, DePlaen E, Lurquin C, Szikora JP, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994; 180: 35-42.
14. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CLS. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264: 716-719.
15. Van der Bruggen P, Travesari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647.
16. Jager E, Bernhard H, Romero P, Ringhoffer M, Arand M, Karbach J, Ilsemann C, Hagedorn M, Knuth A. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* 1996; 66: 162-169.
17. Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 1996; 67: 54-62.
18. Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12198-12203.
19. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999; 80: 219-230.
20. Disis ML, Cheever MA. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 637-642.
21. Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, Cheever MA. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1289-1297.

VERTIENTES

22. Tindle RW. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 643-650.
23. Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 186: 695-704.
24. Zarour HM, Storkus WJ, Brusica V, Williams E, Kirkwood JM. NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ cells. *Cancer Res* 2000; 60: 4946-4952.
25. Zeng G, Wang X, Robbins PF, Rosenberg SA, Wang RF. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3964-3969.
26. Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9461-9465.
27. Jager E, Jager D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjatich S, Stockert E, Arand M, Old LJ, et al. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* 2000; 191: 625-630.
28. Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, Giovarelli M, Rossi I, Nanni P, De Giovanni C, et al. Interleukin-12 mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 1998; 188: 589-596.
29. Amici A, Venanzi FM, Concetti A. Genetic immunization against neu/erbB2 transgenic breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 183-190.
30. Wei WZ, Shi WP, Galy A, Lichlyter D, Hernandez H, Groner B, Hilburn L, Jones RF. Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA. *Int J Cancer* 1999; 81: 748-754.
31. Esserman LJ, Lopez T, Montes R, Bald NL, Fendly BM, Campbell MJ. Vaccination with the extracellular domain of p185neu prevents mammary tumor development in neu transgenic mice. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 47: 337-343.
32. Cefai D, Morrison BW, Sckell A, Favre L, Leunig M, Gimmi CD. Targeting HER-2/neu for active-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 393-400.
33. Rovero S, Amici A, Di Carlo E, Bei R, Nanni P, Quaglino E, Porcedda P, Boggio K, Smorlesi A, Lollini P, et al. DNA vaccination against rat Her-2/neu p185 more efficiently inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 2000; 165: 5133-5142.
34. Dakappagari NK, Douglas DB, Triozzi PL, Stevens VC, Kaumaya PT. Prevention of mammary tumor with a chimeric HER-2 B-cell epitope peptide vaccine. *Cancer Res* 2000; 60: 3782-3789.
35. Pupa SM, Invernizzi AM, Forti S, Di Carlo E, Musiani P, Nanni P, Lollini P, Meazza S. Prevention of spontaneous neu-expressing mammary tumor development in mice transgenic for rat proto-neu by DNA vaccination. *Gene Ther* 2001; 8: 75-79.
36. Foy TM, Bannink J, Sutherland RA, McNeill PD, Moulton GG, Smith J, Cheever MA, Grabstein K. Vaccination with Her-2/neu DNA or protein subunits protects against growth of a Her-2/neu-expressing murine tumor. *Vaccine* 2001; 19: 2598-2606.
37. Rovero S, Boggio K, Di Carlo E, Amici A, Quaglino E, Porcedda P, Musiani P, Forni G. Insertion of the DNA for the 163-171 peptide of IL1b enables a DNA vaccine encoding p185^{neu} to inhibit mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic BALB-c mice. *Gene Ther* 2001; 8: 447-452.
38. Di Carlo E, Rovero S, Boggio K, Quaglino E, Amici A, Smorlesi A, Forni G, Musiani P. Inhibition of mammary carcinogenesis by systemic IL-12 or p185^{neu} DNA vaccination in Her-2/neu transgenic BALB/c mice. *Clin Cancer Res Suppl* 2001; 7: 830-837.
39. Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, Pupa SM, Rossi I, Colombo MP, Ricci C, et al. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic IL-12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 2001; 194: 1195-1206.
40. Reilly RT, Machiels JP, Emens LA, Ercolini AM, Okoye FI, Lei RY, Weintraub D, Jaffee EM. The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 880-883.
41. Pilon SA, Piechocki MP, Wei WZ. Vaccination with cytoplasmic ErbB-2 DNA protects mice from mammary tumor growth without anti-ErbB-2 antibody. *J Immunol* 2001; 167:3201-3206.
42. Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, Zimmerman W. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994; 54: 4169-4176.
43. Clarke P, Mann J, Simpson JF, Rickard-Dickson K, Primus FJ. Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy. *Cancer Res* 1998; 58:1469-1477.
44. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, MHC-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7159-7163.
45. Taylor-Papadimitriou J, Finn OJ. Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins. *Immunol Today* 1997; 18: 105-107.
46. Mizobata S, Tomkins K, Simpson JF, Shyr Y, Primus FJ. Induction of cytotoxic T cells and their antitumor activity in mice transgenic for carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 285-295.
47. Xiang R, Siletti S, Lode HN, Dolman CS, Ruehlmann JM, Niethammer AG, Pertl U, Gillies SD, Primus FJ, Reisfeld RA. Protective immunity against human carcinoembryonic antigen (CEA) induced by an oral DNA vaccine in CEA-transgenic mice. *Clin Cancer Res Suppl* 2001; 7:856-864.
48. Acres B, Apostolopoulos V, Balloul JM, Wreschner D, Xing PX, Ali-Hadji D, Bizouarne N, Keiny MP, McKenzie IFC. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48:588-594.